

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 548–551

Beseitigung des Störeinflusses von Dextran auf die Bestimmung von Serumprotein mit der Biuretreaktion durch Dextranase

Von S. M. NAZAR und H. SCHMIDT

*Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H. J. Dulce)
Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin*

(Eingegangen am 10. Juli/24. August 1972)

Zur Beseitigung von Trübungen durch Dextran bei der Bestimmung von Protein mit der Biuretreaktion eignet sich am besten eine vorherige Probenbehandlung mit Dextranase.

The use of dextranase to remove the interference by dextran in the determination of serum proteins by the biuret reaction

Interference of Dextran in the biuret-reaction may be overcome by treatment of the samples with dextranase.

Dextran ist ein in der Klinik und im Rettungsdienst vielverwendeter Plasmaexpander. Sein Einfluß auf verschiedene klinisch chemische Untersuchungsmethoden wurde von APPEL et al. (1) und ARONSSON et al. (2) beschrieben, wobei letzterer besonders auf die Biuretreaktion einging. JACOBSSON et al. (3) empfahlen Fällung des Serums mit Trichloressigsäure und Aufnehmen des dextranfreien Niederschlags in Natronlauge zur Durchführung der Biuretreaktion. RICHTERICH (4) empfiehlt ebenfalls die Eiweißfällung bzw. die Eliminierung der Dextrane durch Zentrifugation. HOFFMANN et al. (5) geben an, daß durch Zusatz von Harnstoff in einer Endkonzentration von 6 mol/l zum Biuretreagens Trübungen, bedingt durch Dextran, nicht beseitigt werden.

Da die Durchführung einer Eiweißfällung oder eine zusätzliche Zentrifugation relativ aufwendig ist, versuchten wir, den Einfluß von Dextran auf die Biuretreaktion durch Abbau des Dextrans mittels Dextranase zu beseitigen. Dextranase kann auch bei der mechanisierten Biuretmethode angewandt werden. Außerdem wurden Vergleichsmessungen der Biuretreaktion nach Eiweißfällung, Zentrifugation, Verwendung von 6 mol/l Harnstoff im Reagenz, Einwirkung von α -Amylase (EC 3.2.1.1) und Dextranase (EC 3.2.1.11) durchgeführt.

Material und Methoden

Die Bestimmung des Gesamteiweißes im Serum erfolgte mit der von RICHTERICH (4) angegebenen Biuretmethode in Anlehnung an die Angaben von KINGSLEY (6) und WEICHELBAUM (7). Biuretsammlösung (45 g Kalium-Natrium-Tartrat \cdot 4 H₂O, 15 g Kupfersulfat \cdot 5 H₂O, 5 g Kalium-Jodid mit 0,2 mol/l Natronlauge ad 1000 ml) wurde täglich mit Biuretsverdünnungslösung (5 g Kalium-Jodid mit 0,2 mol/l Natronlauge ad 1000 ml) 1:5 verdünnt. 0,1 ml klares, hämolysefreies Serum wurden mit einem Verdünnungsautomaten (Dilumatik, Braun Melsungen) mit 5 ml Reagenzlösung verdünnt und 30 min stehen gelassen. Die Farblösung wurde bei einer Wellenlänge von 546 nm mit Absaugküvetten von 1 cm Schichtdicke am Photometer Eppendorf gegen

einen Leerwert gemessen. Das Ergebnis wurde an einem an das Photometer angeschlossenen digitalen Voltmeter (Hartmann und Braun Elektronik) in g/l abgelesen (BORNER et al.) (8). Die Eichung des Verdünnungsautomaten wurde für das Probenvolumen gravimetrisch und für die Reagenzlösung volumetrisch durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle wurde für die Präzision in Serie ein Rinderserum (BORNER et al.) (9) und für die Richtigkeit Human Protein Standard (Dade) verwandt.

Zur Untersuchung des Einflusses von Dextran auf die Biuretreaktion und der Möglichkeiten zur Beseitigung dieses Einflusses wurden Serumverdünnungen mit verschiedenen Mengen Macro-dexlösung (6proz. wäbr. Dextranlösung mit einem mittleren Molekulargewicht von 60000), Rhocomacrodexlösung (10proz. wäbr. Dextranlösung mit einem mittleren Molekulargewicht von 40000) und Dextran M (mittleres Molekulargewicht 60000) hergestellt. Serien dieser Proben wurden mit Serien von Proben verglichen, bei denen die entsprechenden Verdünnungen mit physiol. NaCl-Lösung hergestellt worden waren. Folgende Möglichkeiten zur Beseitigung des Dextraneinflusses wurden untersucht:

1. Das Eiweiß aus 0,1 ml dextranhaltiger Serumprobe wurde mit 2 ml 10proz. Trichloressigsäure in Zentrifugengläsern mit rundem Boden gefällt und zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Sediment mit 5 ml Reagenzlösung unter starkem Schütteln (Whirly-Mixer) versetzt und nach 30 min stehen photometriert.
2. Proben wurden 30 min nach Zugabe der Reagenzlösung 5 min bei 3000 U/min (1700 g) zentrifugiert und dann photometriert. Einige Proben wurden bei 10000 U/min (etwa 10000 g) 5 min zentrifugiert und dann photometriert.
3. Dextranhaltige Proben wurden mit einem Biuretreagens, dem Harnstoff in einer Endkonzentration von 6 mol/l zugesetzt war (5), untersucht.
4. Die Biuretreaktion wurde in Probenreihen mit verschiedenen Dextrankonzentrationen, die mit α -Amylase (EC 3.2.1.1) (Diastase, Merck, 2,6 U/mg) bzw. Dextranase¹⁾ (EC 3.2.1.11) (technical grade, 42 U/mg) inkubiert worden waren, durchgeführt. Dazu wurden 0,1 ml dextranhaltige Serumprobe mit 2 ml Puffer-Enzym-lösung 10 bzw. 30 min bei Raumtemperatur bzw. 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml einer entsprechend konzentrierteren Biuret-Reagenzlösung hinzugegeben, so daß die Endkonzentration an Probe und Biuretreagens den Vergleichsproben entsprach. Der pH-Wert des Puffergemisches wurde für die Versuche mit α -Amylase in einer Serie auf pH = 5, in einer anderen

¹⁾ Dextranase aus *Penicillium*-Species der Fa. Worthington, deutsche Vertretung Welding & Co, Frankfurt am Main.

auf pH = 7 eingestellt. Die Dextranase wurde in einer Pufferlösung von pH = 5 (0,1 mol/l Citrat-Natronlauge, Merck) verwendet, bei 4°C aufbewahrt und wöchentlich neu angesetzt.

Ergebnisse

Dextran in Form von Macrodex und Rheomacrodex beeinflusst die photometrische Messung des Gesamteiweißes von klaren, hämolysefreien Serumproben mittels Biuretreaktion dadurch, daß eine Trübung des Ansatzes während der Reaktionszeit entsteht. Die Stärke der Trübung ist abhängig von der Dextrankonzentration. Konzentrationen unter 0,8 g Dextran pro Liter Serum beeinflussen die Bestimmung nicht. Konzentrationen um 1,0 g/l geben aufgrund einer feinen, mit dem bloßen Auge nicht wahrnehmbaren Trübung erhöhte Gesamteiweißwerte. Die in Abbildung 1 dargestellte obere Kurve zeigt eine zunehmende Streuung der scheinbaren Eiweißkonzentrationen, die durch ein unterschiedliches Erscheinungsbild der Trübung von feiner bis grober Dispersion bedingt ist. Bei den 12 Serien zu je 10 Proben unserer Versuche lagen die Eiweißkonzentrationen zwischen 54 g/l und 73 g/l. Höhere Eiweißkonzentrationen bei gleichen Dextrankonzentrationen ergeben geringere scheinbare Eiweißvermehrungen.

Eine Fällung des Serumeiweißes mit Trichloressigsäure und Durchführung der Biuretreaktion im Niederschlag ergibt für dextranhaltige Proben (um 1 g/l) bis zu 3% zu niedrige Werte. Mit zunehmender Dextrankonzentration (bis 20 g/l) steigt die scheinbare Eiweißvermehrung bis auf 130% an. Die Streuung bei diesem

Verfahren lag zwischen 7% und 12%. (Sämtliche Streuungen sind Variationskoeffizienten der Standardabweichung (1 s-Bereich) von Serie zu Serie mit $n = 10$). Es ist zu berücksichtigen, daß sich nach der Fällung das Probenvolumen ändert, es bleiben nach dem Abgießen des dextranhaltigen Überstandes etwa 130 mg Eiweiß und Überstandsrest ($131 \text{ mg} \pm 9,3\%$) zurück, das entspricht etwa einem wasserhaltigen Probenvolumen von 0,115 ml, damit bleibt der Verdünnungsfehler für den Reaktionsansatz unter 1%.

Die Zentrifugation des Reaktionsansatzes vor der photometrischen Messung hatte auf die Trübung bei Proben mit Rheomacrodex einen geringeren Einfluß als auf Proben mit Macrodex. So ergaben 10 g/l Rheomacrodex $147,2\% \pm 14,6\%$ und 10 g/l Macrodex $125,8\% \pm 16,3\%$ gegenüber 100% Eiweiß dextranfreier Proben.

Ein Zusatz von Harnstoff zum Biuretreagens führt, wie von HOFFMANN (5) angegeben, zu niedrigeren Gesamteiweißwerten. Bei dextranhaltigen Proben nimmt auch dabei mit steigender Konzentration scheinbar der Eiweißgehalt durch Trübung zu. Diese Trübung ist jedoch auch bei hohen Dextrankonzentrationen offenbar wegen der feinen Verteilung mit dem Auge nicht zu erkennen. Die scheinbare Zunahme des Eiweißgehaltes betrug bei der höchsten verwendeten Dextrankonzentration 16% gegenüber dextranfreier Probe ohne Harnstoff im Reagenz und 19% gegenüber dextranfreier Probe mit Harnstoff im Reagenz.

Die Einwirkung von α -Amylase in der höchsten angewandten Konzentration von 100 mg/l bei pH 5 und

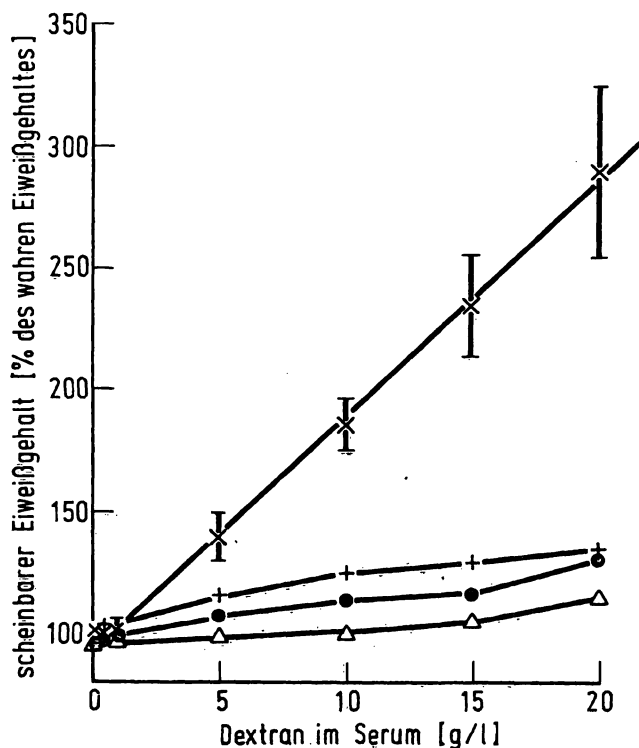


Abb. 1

Biuretreaktion dextranhaltiger Serumproben: ohne zusätzliche Behandlung des Ansatzes (x-x), nach Trichloressigsäurefällung (•-•), nach Zentrifugation des Reaktionsansatzes (+-+), mit 6 mol/l Harnstoff im Biuretreagens (Δ-Δ)

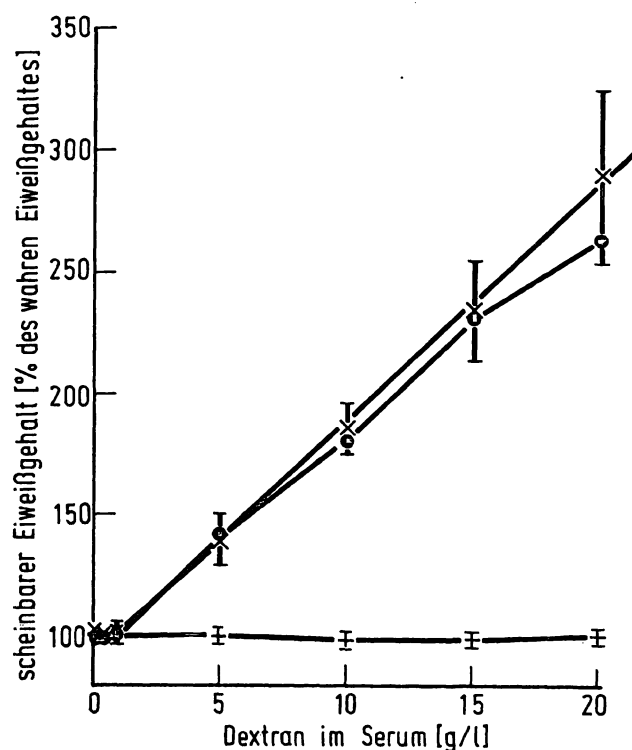


Abb. 2

Biuretreaktion dextranhaltiger Serumproben: ohne zusätzliche Behandlung des Ansatzes (x-x), nach Einwirkung von α -Amylase (30 min 37°C) (•-•), nach Einwirkung von Dextranase (20 µg pro 0,1 ml Serum, 10 min Raumtemperatur) (+-+)

Tab. 1

Bestimmung der minimalen Dextranasekonzentration zur Beseitigung des Einflusses von Dextran 6 g/l und 20 g/l auf die Biuretreaktion: Serumverdünnung ohne Dextran entspricht 100%

Dextranase in Puffer pH 5 [mg/l]	Raumtemperatur				37°C			
	10 min		30 min		10 min		30 min	
	6 g/l	20 g/l	6 g/l	20 g/l	6 g/l	20 g/l	6 g/l	20 g/l
0,1	159	261	146	258	151	257	106	247
0,2	156	249	134	227	143	226	103	197
0,3	146	247	106	212	138	206	100	135
0,4	143	245	103	182	134	175		101
0,5	137	242	100	153	130	150		100
1,0	121	241		102	110	105		
2,0	108	160		100	100	100		
2,5	102	131						
5,0	100	106						
7,5		104						
10,0		100						

7, bei Raumtemperatur und 37°C und 10 bzw. 30 min auf Serum mit verschiedenen Dextrankonzentrationen, ergibt die gleichen, scheinbaren Gesamteiweißkonzentrationszunahmen wie bei der Biuretreaktion ohne α -Amylase (Abb. 2). Eine weitere Erhöhung der α -Amylasemenge kommt nicht in Frage, weil schon mit der angewandten Menge eine zusätzliche Eiweißerhöhung um 2,5% erfolgt.

Dextranase baut das Dextran soweit ab, daß die Spaltprodukte keine Trübung mehr hervorrufen (Abb. 2). Die Streuungen bei diesem Verfahren liegen ebenso wie für die Gesamteiweißbestimmung im Routinelabor zwischen 2% und 3%. Es wurde die minimal erforderliche Konzentration an Dextranase für Serum mit Dextrankonzentrationen von 20 g/l und 6 g/l unter verschiedenen Bedingungen bestimmt (Tab. 1). Das Auftreten von Trübungen beim Vorliegen von Dextran in einer Konzentration von 20 g/l wird verhindert, wenn Dextranase in einer Konzentration von 10 mg/l 10 min bei Raumtemperatur einwirkt. Eine längere Einwirkzeit bzw. eine höhere Inkubationstemperatur ermöglicht den Einsatz einer geringeren Enzymkonzentration. Die Eiweißvermehrung des Ansatzes durch Dextranase in der angegebenen Konzentration beträgt für eine Probe mit einem Gesamteiweißgehalt von 80 g/l 0,25%.

Diskussion

Bei der Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes im Serum mit der Biuretmethode beobachtet man eine scheinbare Erhöhung des Ergebnisses, wenn Dextran im Serum anwesend ist, weil dieses zu einer Trübung des Reaktionsansatzes führt. Für die Verhinderung dieses Effekts sind bisher verschiedene Verfahren angewendet worden, die jedoch alle nicht befriedigend sind.

1. Wird das Serumeiweiß zunächst mit Säure gefällt und nach Auflösung im Biuretreagenz bestimmt, ergeben sich bei Abwesenheit von Dextran oder beim Vorliegen niedriger Konzentrationen (bis 1 g/l) zu niedrige Werte, entweder, weil die Eiweißfällung nicht vollständig ist, oder, weil die Photometrie störende Substanzen im Überstand verbleiben. In Gegenwart

höherer Dextrankonzentrationen resultieren erhöhte Eiweißwerte, weil dann anscheinend bei der Fällung Dextran mitgerissen wird.

2. Die Zentrifugation des trüben Reaktionsansatzes mit 3000 U/min führt zwar zur deutlichen Verminderung der Trübung, jedoch gibt es mit steigender Dextrankonzentration erhöhte Extinktionen. Hierbei führt Rheomacrodex zu höheren Ergebnissen als Macrodex; dies ist durch das niedrigere Molekulargewicht des Rheomacrodex zu erklären, das zu einer feineren Trübung führt. Eine hochtourige Zentrifugation bei ungefähr 10000 g klärt den Ansatz völlig.

3. Harnstoffzusatz im Biuretreagenz verringert ebenfalls den Trübungseinfluß. Berücksichtigt man jedoch, daß Harnstoff schon bei normalen, nicht trüb erscheinenden Serumeiweißproben um 4% zu niedrige Werte ergibt (5), so liegen auch hier die Gesamteiweißwerte bei dextranhaltigen Proben zu hoch.

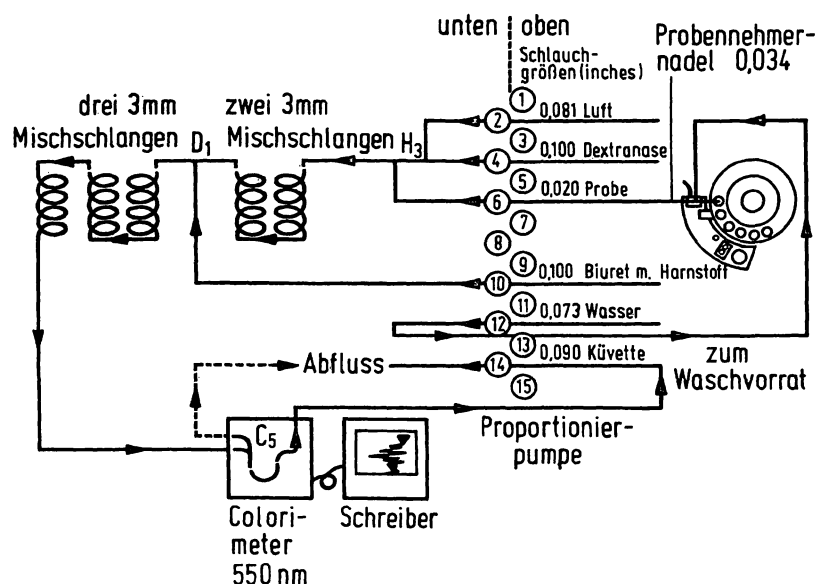
Von den genannten Verfahren, die zwar alle den Einfluß des Dextrans auf die Biuretreaktion verringern, stellt nur eine hochtourige Zentrifugation eine Möglichkeit dar, den wahren Proteingehalt zu ermitteln. Eine solche Zentrifuge dürfte jedoch den meisten klinisch chemischen Laboratorien nicht zur Verfügung stehen.

α -Amylase ist nicht in der Lage, Dextran so zu spalten, daß es bei der Biuretreaktion nicht mehr stört. Die Ursache liegt darin, daß α -Amylase 1,4-Bindungen spaltet, während Dextran im Macrodex zu 90% aus 1,6 Bindungen besteht und nur die restlichen 10% aus anderen (1,3- und 1,4-)Bindungen aufgebaut sind.

Als geeignetes Verfahren für die Bestimmung des wahren Eiweißgehaltes erwies sich bei allen klinisch relevanten Dextrankonzentrationen die Vorbehandlung der Proben mit Dextranase. Dextranase katalysiert die hydrolytische Spaltung von 1,6 α -glykosidischen Bindungen. Das Verfahren liefert gute reproduzierbare Werte, erfordert einen geringen Zeitaufwand und ist auch bei mechanisierten Bestimmungsmethoden der Biuretreaktion ohne größeren Aufwand anwendbar.

Durch die Verwendung von Dextranase wird die Biuretmethode auch bei Anwesenheit von Dextran den Ansprüchen als „Standard Method of Clinical Chemistry“

Abb. 3
Fließdiagramm für Auto-Analyzer:
Gesamteiweiß mit Dextranase



(REINHOLD) (10) gerecht. Die Streuung liegt wie bei der üblichen Biuretreaktion zwischen 2% und 3% für den 1-s Bereich. Der Preis der für einen Ansatz erforderlichen Dextranase beträgt weniger als einen Pfennig.

Bei der Verwendung des Auto-Analyzers für die Gesamteiweißbestimmung können die Proben ebenfalls vorher mit Dextranase inkubiert werden. Zu diesem Zweck ist ein doppelt konzentriertes Biuretreagens zu verwenden, das später durch die Dextranase, wenn diese mit der Probe durch zwei Mischschlangen gegangen ist, wieder auf die übliche Konzentration verdünnt wird (Abb. 3). Bei Verwendung von 6 mol/l Harnstoff im Reagens und der Dextranasevorinkubation der Probe würde sich eine „blank“ Korrektur der Proben erübrigen.

Bei der Verwendung von diskontinuierlichen Automaten empfiehlt es sich, die Proben ebenfalls mit Dextranase vorzinkubieren und später das harnstoffhaltige Biuretreagens zuzusetzen. Ein Zusatz von Dextranase zum Biuretreagens ist wegen des pH-Optimums der Dextranase bei pH = 5 nicht möglich.

Die sehr spezifische Biuretmethode, die im Routinelabor allen anderen Eiweißbestimmungsmethoden überlegen ist, kann durch verschiedene Ursachen gestört und durch mehrere Verfahren von den Störungen befreit werden. So empfehlen SZARKOWSKA et al. (11) und

BODE et al. (12) bei der Verwendung von trüben Proben die Entfärbung des Kupferkomplexes nach der Biuretreaktion mit KCN zur Ermittlung des Trübungswertes. Zur Vermeidung des häufig mit dem Auge nicht sichtbaren Trübungsfehlers von Seren empfehlen HOFFMANN et al. (5) die Verwendung von Harnstoff im Biuretreagens. Dextranase befreit die Biuretreaktion von der weiteren Fehlermöglichkeit durch Dextran. Dadurch ist es möglich, den Eiweißgehalt im Serum z. B. postoperativ auch nach Gabe von Dextran als Plasmaexpander mit der Biuretreaktion zu bestimmen. Die von uns zur Untersuchung gewählte maximale Dextrankonzentration entspricht einer Plasmaverdünnung von 1 Teil 6proz. Macrodex und 2 Teilen Plasma; es dauert hierbei nach den Angaben von HAMMARSTEN et al. (13) mehr als zwei Tage, bis die Dextrankonzentration unter die Störgrenze von 0,8 g/l gesunken ist. Aber gerade postoperativ ist die baldmöglichste Bestimmung des Gesamteiweißes häufig klinisch erforderlich.

In Zentrallaboratorien, die große chirurgische Abteilungen versorgen, kann die Dextranstörung so häufig sein, daß alle Proben mit Dextranase behandelt werden sollten. Bei anderem Krankengut brauchen nur verdächtige Proben einer besonderen Behandlung unterworfen zu werden. Eine Verwendung von Harnstoff in einer Endkonzentration von 6 mol/l im Biuretreagens sollte in jedem Fall Verwendung finden.

Literatur

1. APPEL, W., WIRMER, V. & EBENEZER, ST. (1968), *Anaesthesist* 17, 95—105. — 2. ARONSSON, T., ARTURSON, G. & WALLENIS, G. (1966), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18, 458—460. — 3. JACOBSON, L. & HANSEN, H. (1953), *Nord. Med.* 49, 362—365. — 4. RICHTERICH, R. (1971), *Klinische Chemie, Theorie und Praxis*, 3. Aufl., S. 305—309, Karger Verlag Basel-New York. — 5. HOFFMANN, J. P. & RICHTERICH, R. (1970), *diese Z.* 8, 595—598. — 6. KINGSLEY, G. R. (1942), *J. Lab. Clin. Med.* 27, 840—845. — 7. WEICHSELBAUM, T. E. (1946), *Amer. J. Clin. Pathol.* 10, 40—49.

8. BORNER, K. & KLEIN, E. (1969), *diese Z.* 7, 185—188. — 9. BORNER, K., FABRICIUS, W. & MAROWSKI, B. (1970), *diese Z.* 8, 170—172. — 10. REINHOLD, J. G. (1953), *Standard Methods of Clinical Chemistry*, Bd. 1, S. 88—97. Acad. Press Inc., N. Y. — 11. SZARKOWSKA, L. & KLINGENBERG, M. (1963), *Biochem. Z.* 338, 674—697. — 12. BODE, CH., GOEBELL, H. & STÄHLER, E. (1968), *diese Z.* 6, 418—422. — 13. HAMMARSTEN, J. F., HELLER, B. I. & EBERT, R. V. (1953), *J. Clin. Invest.* 32, 340—344.

Helmut Schmidt
Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
Klinikum Steglitz
1 Berlin 45
Hindenburgdamm 30